

## Recherche des anticorps anti-*Mycoplasma mycoides* au moyen d'un test de floculation

P. PERREAU et J. MONNIER (\*)

avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> P. PERREAU

### RESUME

Les anticorps spécifiques de *M. mycoides* peuvent être décelés et mesurés dans le sérum des bovins au moyen d'un test de floculation.

Les mesures sont effectuées par néphélométrie, au moyen d'un spectrophotomètre, sur les mélanges sérum-antigène; cet antigène est préparé par traitement aux ultra-sons d'une suspension dense de mycoplasmes.

Ce test, après avoir fait l'objet d'un schéma théorique, est mis à l'épreuve sur 144 sérums de bovins (indemnes, vaccinés, malades naturels); les résultats obtenus sont soumis à une première interprétation comparative avec ceux fournis par les tests sérologiques habituels.

Il apparaît certain que tous les antigènes constituant de *M. mycoides* interviennent dans ce test de floculation et son intérêt s'en trouve donc accru.

Les tests sérologiques appliqués à la recherche et à la mesure des anticorps anti-*Mycoplasma mycoides* sont déjà nombreux; ils découlent tous de travaux orientés vers la mise au point de procédés commodes et spécifiques de diagnostic de l'infection par *M. mycoides*. Leurs avantages et inconvénients respectifs ont fait l'objet de multiples essais comparatifs (2, 3, 8, 9, 10) et aucun de ces tests ne peut être encore aujourd'hui considéré comme le moyen idéal de diagnostic, c'est-à-dire celui qui va permettre de déceler sans exception tous les bovins infectés.

C'est aussi la recherche d'une méthode, sinon parfaite, du moins plus satisfaisante que les précédentes, qui nous a conduit à l'essai du test de floculation décrit dans ce travail, test d'ordre expérimental pour l'instant et dont nous essaierons d'apprécier la valeur.

Depuis plusieurs années, l'utilisation fréquente dans notre laboratoire d'un antigène total de *M. mycoides* obtenu par traitement aux ultra-sons nous avait montré qu'avec des sérums nettement positifs selon les réactions classiques de sérodiagnostic, on pouvait mettre en œuvre un test de floculation. Cependant la lecture de ce test ne pouvait se faire commodément que pour les basses dilutions de ces sérums (1/2, 1/5, 1/10), la sensibilité de l'œil devenant très vite insuffisante pour examiner les dilutions plus élevées; il apparaissait ainsi que l'intensité du phénomène décroissait rapidement dans l'ordre des dilutions, sans phénomène de « floculation initiale » indiquant un rapport optimal des quantités d'antigène et d'anticorps.

A nos yeux, cette réaction possédait *a priori* un intérêt indiscutable, celui de faire entrer en jeu tous les antigènes de *M. mycoides* et non plus seulement les antigènes de surface, le galactane en particulier. Il valait la peine d'en rechercher un protocole technique satisfaisant

(\*) Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, 10, rue Pierre Curie, 94 Maisons-Alfort (Val-de-Marne).

et ensuite d'en apprécier ses possibilités; voici donc cette méthode et ses résultats.

## MATERIEL ET METHODES

### A. Antigène

Les souches de *M. mycoides* employées sont des souches virulentes (Afadé, Fatick), n'ayant que deux ou trois subcultures depuis leur isolement; des flacons de 10 litres d'un milieu déjà décrit (6) sont ensemencés et mis à 37° C durant 4 à 5 jours, sans agitation aucune.

Les mycoplasmes sont récoltés au moyen d'une centrifugeuse réfrigérée Servall RC-2 et du système Szent-Giorgyi à débit continu, à 4° C et 27.000 g (rotor SS 34).

Ils subissent ensuite 3 centrifugations de lavage dans du P.B.S., toujours à 4°, puis sont remis en suspension homogène dans du tampon de Mayer (1) à pH 7,2 et à l'opacité du tube n° 50 de Brown.

Cette suspension est soumise à l'action des ultra-sons (appareil MSE Mullard, 60 watts, 20 kilocycles/seconde), en évitant tout échauffement, durant une heure; une dernière centrifugation de 30 minutes à 12.000 g sépare un culot et le surnageant qui constitue notre antigène (appelé antigène U.S.).

Rappelons que des préparations identiques ou très voisines ont servi depuis plusieurs années à un certain nombre de travaux d'ordre sérologique (4, 6, 8).

L'antigène ainsi préparé se conserve au réfrigérateur durant deux à trois semaines sans altération d'ordre physique ou chimique; il est toutefois prudent d'y ajouter du merthiolate de sodium à 1/5000 pour prévenir des contaminations microbiennes accidentelles.

### B. Sérums

Les premiers essais destinés à mettre au point le protocole technique, utilisèrent un sérum fortement précipitant, préparé artificiellement sur mouton, selon un protocole déjà décrit (7).

(1) Il s'agit du diluant préconisé pour la fixation du complément; nous utilisons les comprimés OXOID (BR 16) qu'il suffit de diluer dans un volume approprié d'eau distillée.

Ensuite la méthode fut éprouvée sur :

a) 73 sérums de bovins de France, en toute certitude indemnes de péripneumonie :

20 veaux de boucherie, âgés de 2 à 3 mois, envoyés à l'abattoir d'Ivry-sur-Seine.

17 bovins de boucherie adultes (bœufs et vaches de réforme), abattus au même endroit.

36 bovins reproducteurs, dont les sérums furent reçus du Laboratoire National de Recherches Vétérinaires (2) où ils avaient été envoyés pour des tests sérologiques de contrôle.

b) 71 sérums (3) de bovins africains (zébus et taurins) : 18 vaccinés et 53 infectés de péripneumonie, d'origine diverse : Côte d'Ivoire, Ethiopie, Niger, Sénégal.

### C. Protocole et lecture de la réaction

L'œil, nous l'avons déjà dit, ayant une sensibilité insuffisante, nous avons eu recours à l'emploi d'un spectrophotomètre Zeiss PMQII (4) pour les mesures de néphélométrie. En effet les variations de la densité optique enregistrée ne sont pas ici le fait d'une simple absorption; à celle-ci s'ajoute la diffusion de lumière provoquée par les particules du complexe antigène-anticorps.

Après un certain nombre d'essais préliminaires sur les résultats desquels nous reviendrons, le protocole (5) suivant fut établi :

1. La longueur d'onde choisie est de 450 mμ; elle correspond à une zone du spectre où la sensibilité est bonne.

2. La fente du spectrophotomètre est réglée à 0,05 mm.

3. Tous les sérums sont dilués au 1/5 dans le tampon de Mayer; on n'utilise en effet qu'une seule dilution.

4. L'antigène est dilué au 1/10 dans ce même tampon.

(2) Echantillons reçus de notre confrère R. GAUMONT, auquel vont nos remerciements.

(3) Ces sérums avaient été reçus à Maisons-Alfort pour des études diverses, souvent plusieurs mois auparavant (pour quelques-uns, plusieurs années); ils étaient conservés au congélateur à -26° C. Nous tenons ici à remercier très vivement nos confrères M. DOUTRE (Dakar), FERRY (Niamey), E. P. LINDLEY (Korhogo) et M. VIGIER (Debré-Zeit) pour la collecte et l'envoi de ces échantillons.

(4) Aimablement mis à notre disposition par notre confrère J. P. PETIT, du laboratoire de Biochimie.

(5) Au cours de cette étude, nous avons eu connaissance d'un procédé presque identique appliqué à la sérologie des myxovirus (1).

5. Au commencement d'une série de mesures, on met le tambour au 0 en ne soumettant au faisceau lumineux que le seul tampon de Mayer dont on a rempli la cuve.

6. Le test de floculation s'effectue en mélangeant à parties égales le sérum à examiner (dilué au 1/5) et l'antigène (dilué au 1/10); ce mélange est aussitôt porté dans la cuve et la première lecture faite de façon *immédiate*. Elle sera la mesure du temps 0. Quatre autres mesures de la densité optique sont ensuite effectuées après 15, 30, 45 et 60 minutes.

Ces temps arbitraires sont suffisants pour voir s'établir le phénomène sérologique de floculation; lorsqu'on veut le suivre de façon très précise, on rapproche les mesures de 5 en 5 minutes et on peut allonger le temps total d'observation à 2 heures; il n'y a aucun intérêt à le prolonger.

Le résultat chiffré, qui apprécie la variation de densité optique, est obtenu par différence entre la mesure finale et la mesure du temps 0; il est donné en millièmes<sup>(6)</sup> de densité optique, le spectrophotomètre utilisé étant très sensible.

#### D. Tests sérologiques comparatifs

C'est en soumettant les mêmes sérums aux épreuves sérologiques classiques et en comparant les résultats qu'on a tenté d'apprécier la valeur clinique et immunologique du test de floculation.

1. Agglutination rapide sur lame : effectuée avec l'antigène au violet de méthyle de l'I.E.M.V.T. (la suspension de mycoplasmes qui le constitue correspond au tube n° 30 de Brown).

2. Hémagglutination indirecte en tubes : effectuée selon une méthode déjà décrite (5).

3. Agglutination des particules de latex : effectuée selon une méthode déjà décrite (4).

4. Fixation du complément : pour la plupart des sérums, nous avons utilisé simultanément deux méthodes, celle de CAMPBELL et TURNER (mais avec 2 unités d'antigène au lieu de 5) et celle plus sensible qui dérive de la

fixation de KOLMER, souvent utilisée dans les laboratoires de l'Afrique francophone (Dakar, Fort-Lamy).

5. Précipitation interfaciale en milieu liquide : dans un tube de faible diamètre (2 mm), on superpose le sérum non dilué et l'antigène « ultra-sons », dilué à 1/4; la recherche du disque de précipitation s'effectue par observation durant 20 minutes. Au bout de ce délai, la réaction est considérée comme négative si aucun disque n'est apparu. Cette méthode n'a pas été employée systématiquement, elle a servi de contrôle pour certains sérums.

6. Précipitation en milieu gélifié : exécutée selon un protocole simple déjà décrit (6).

Cette réaction est utilisée non pour la recherche des anticorps précipitants, mais pour la recherche de l'antigène circulant dans le sérum des bovins suspects, à l'aide d'un sérum de mouton anti-*M. mycoides*; les boîtes de Pétri sont conservées pendant une semaine à la température ambiante.

## RESULTATS

### A. Schéma théorique de la réaction de floculation

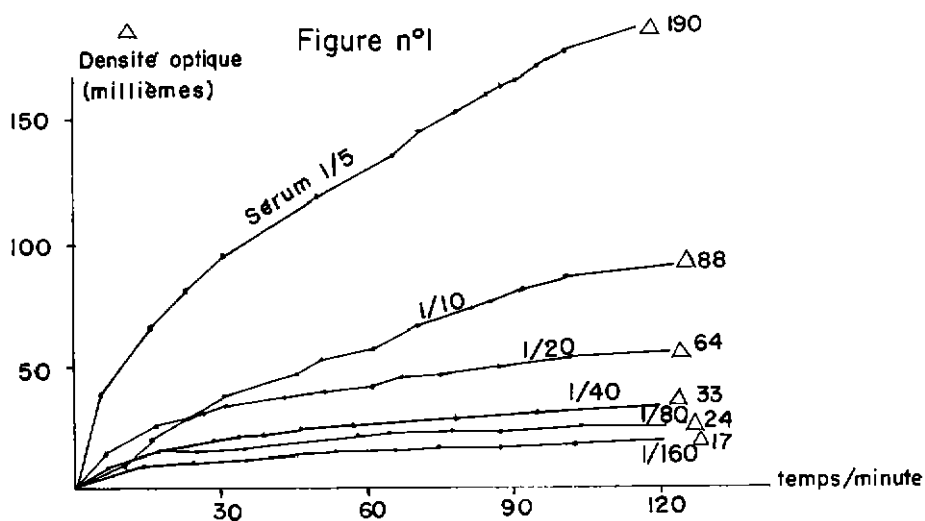
Lorsqu'on mélange dans les conditions précédemment indiquées un sérum précipitant et l'antigène total de *M. mycoides*, il apparaît très vite, *dans les minutes qui suivent*, un phénomène de floculation dû à la formation d'un immun-précipité dispersé. L'opacité du mélange s'accroît avec le temps durant deux heures environ, entraînant une augmentation correspondante de la densité optique.

Les courbes suivantes illustrent ce phénomène dont l'intensité croît avec la concentration des anticorps lorsque la quantité d'antigène est fixe et *vice versa* (figures n° 1 et n° 2).

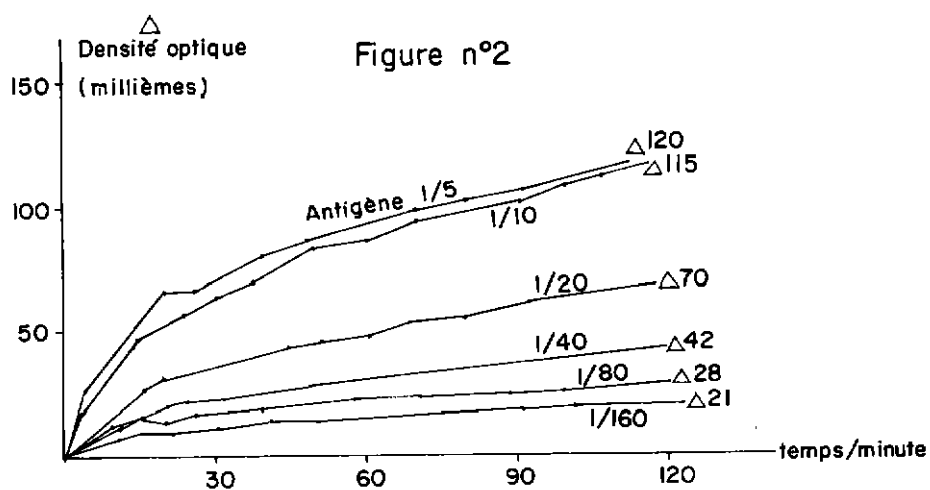
On voit que la floculation est d'apparition rapide et qu'au bout de 5 minutes une augmentation très nette de la densité optique est enregistrée; très significative après 30 minutes, cette variation voit ensuite sa vitesse décroître comme l'indiquent clairement les pentes des courbes.

La réaction est suivie ici pendant deux heures, mais les résultats sont extrêmement nets

(6) Tous les chiffres cités dans cet article et concernant ces mesures de densité optique (D.O.) seront donc des millièmes d'unité. Exemple :  $\Delta$  D.O. : 27 (différence de densité optique de 0.027 unité).



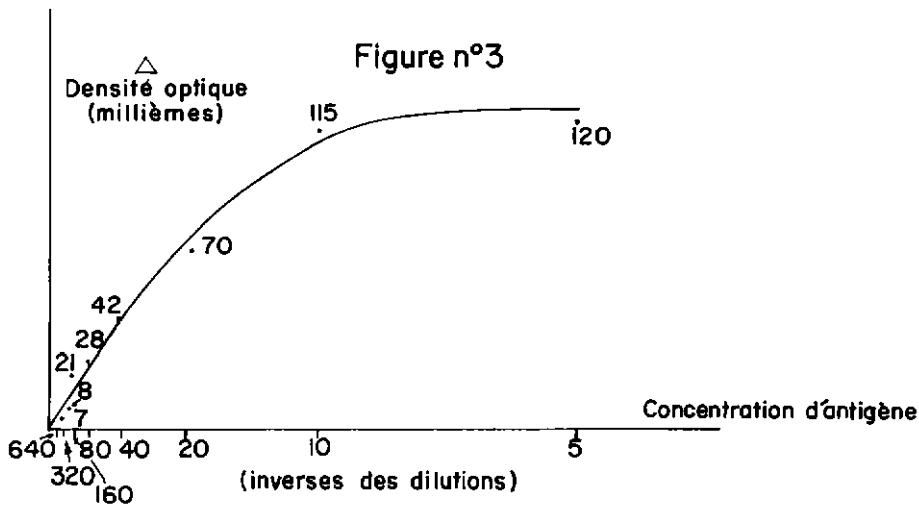
Variation de la densité optique en fonction du temps, pour un système antigène constant (1/10) - sérum variable (1/5 → 1/160).



Variation de la densité optique en fonction du temps, pour un système sérum constant (1/10) - antigène variable (1/5 → 1/160).

au bout de la 1<sup>re</sup> heure et c'est la raison pour laquelle, dans les tests d'application, la différence de densité optique citée ( $\Delta$  D.O.) est obtenue par la soustraction : D.O. 60 minutes - D.O. temps 0.

L'examen des deux courbes suivantes (figures n° 3 et n° 4) montre les relations existant d'une part entre la densité optique et le taux d'anticorps mis en jeu, d'autre part entre cette même densité optique et le taux d'antigène.



Relation entre la variation de densité optique et la concentration de l'antigène.

Cette relation est linéaire avec l'accroissement du taux d'anticorps, en présence d'une quantité fixe d'antigène, tout au moins dans les limites des dilutions que nous utilisons couramment en sérologie (dilutions du sérum allant du 1/5 au 1/640).

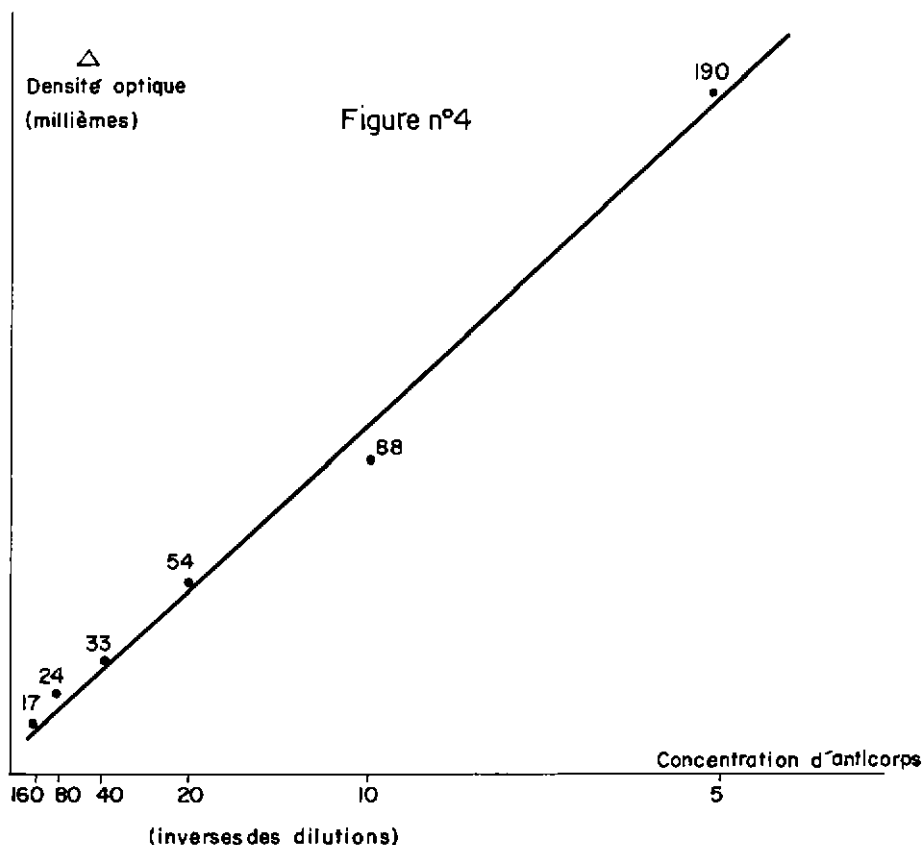
Ce n'est plus vrai avec la variation du taux d'antigène, en présence d'une quantité fixe d'anticorps; on voit notamment qu'un plateau est atteint, en gros à partir d'une concentration d'antigène représentée par la dilution au 1/10.

On trouve là les raisons de l'emploi des dilutions-tests du sérum au 1/5 et de l'antigène au 1/10 dans nos essais de diagnostic sérologique de la péripneumonie.

La température ne semble pas avoir une grosse influence sur ce phénomène de floculation; les courbes enregistrées à 37° et à la température du laboratoire (23 à 25°) sont parallèles, un peu décalées à partir du temps 0, les valeurs des densités optiques enregistrées étant constamment un peu plus faibles à 37°

qu'à la température ambiante, pour un même mélange anticorps-antigène. Il s'ensuit que les valeurs correspondantes des accroissements de densité optique sont sans différence significative.

Un sérum négatif est caractérisé par l'absence d'augmentation de la densité optique après son mélange avec l'antigène; les valeurs successives, lues sur le tambour du spectrophotomètre pendant tout le temps d'observation (1 ou 2 heures) ne diffèrent pas ou ne diffèrent entre elles que par 1 ou 2 millièmes de D.O., ce qui n'a aucune signification. Etant donné la sensibilité de l'appareil utilisé, nous avons été conduits après de multiples mesures à ne tenir aucun compte d'une différence pouvant aller jusqu'à 5 millièmes ( $\Delta$  D.O.  $\leq 5$ ), en plus ou en moins, entre la lecture du temps 0 et la lecture finale. Des variations aussi faibles peuvent être mises au compte de la dérive de l'appareil, de son réglage, d'un rinçage « imparfait » des cuves, de légères modifications de solubilité de certains constituants du mélan-



Relation entre la variation de densité optique et la concentration de l'anticorps.

ge sérum-antigène, etc... Elles sont sans commune mesure, comme on le verra, avec les variations dues au phénomène sérologique spécifique.

### B. Application du test de floculation à la recherche des anticorps anti « *M. mycoides* »

#### I. Animaux indemnes de péripneumonie :

1. Les sérums des 20 veaux de boucherie sont négatifs au test de floculation; un seul sérum, au bout de 30 minutes, a une  $\Delta$  D.O. de 5.

Tous sont négatifs en agglutination rapide sur lame et en fixation du complément; on observe des traces d'hémagglutination pour 4 d'entre eux (3 au 1/10 et 1 au 1/40).

2. Sur les 17 sérums du lot de bovins de boucherie, 15 sont absolument négatifs au test de floculation; pour les deux autres (n° 429 et 446) on observe respectivement des  $\Delta$  D.O. de 8 et 10, dont la signification reste obscure. Il peut s'agir de phénomènes d'ordre non sérologique ou d'ordre sérologique mais non spécifique, en tout état de cause extrêmement discrets.

Tous sont négatifs en agglutination rapide sur lame et en fixation du complément; mais 15 d'entre eux hémagglutinent légèrement les hématies sensibilisées (4 au 1/10 dont les n° 429 et 446, 10 au 1/20, 1 au 1/80); il s'agit de réactions 1 +.

3. Sur les 36 sérums du lot de bovins reproducteurs, 35 sont absolument négatifs, le dernier (n° 66) a une  $\Delta$  D.O. de 13, et là encore

on ne peut en donner l'explication définitive; tous sont négatifs à l'agglutination sur lame et à la fixation du complément. On observe encore des réactions positives légères en hémagglutination indirecte : 16 au 1/10 dont le n° 66, 2 au 1/20, 7 au 1/40, 1 au 1/80.

## II. Animaux vaccinés :

Sur 10 zébus vaccinés dans les trois mois précédents avec un vaccin vivant d'ovoculture (le temps qui sépare la vaccination de la prise du sérum n'est pas connu exactement), 6 ont un sérum négatif; pour les 4 autres, on observe les  $\Delta$  D.O. suivantes : 9, 15, 30 et 35.

Chez 8 zébus vaccinés avec un vaccin tué expérimental et pour chacun desquels on dispose de 2 échantillons de sérums, l'un pris le jour de la vaccination, l'autre deux semaines après, l'apparition d'anticorps vaccinaux est nettement révélée par les méthodes très sensibles : hémagglutination indirecte et fixation du complément type Kolmer. Par contre, les anticorps floculants n'apparaissent que chez 4 animaux, de façon synchrone avec la positivité du test d'agglutination sur lame. Les valeurs de  $\Delta$  D.O. sont 9, 12, 19 et 80. Ce dernier chiffre est surprenant, mais très logique (on le verra par la suite) car le même sérum est simultanément positif à 3+ en agglutination sur lame et à 1/10.240 en agglutination indirecte.

## III. Animaux infectés :

Afin de rendre plus claire l'interprétation des résultats, ces 53 animaux sont classés ici en groupes possédant des caractéristiques cliniques ou sérologiques communes.

### 1. Malades récents ou en phase d'état de la maladie, sérologiquement positifs aux tests classiques :

29 bovins remplissent ces conditions; la  $\Delta$  D.O. moyenne est de 204, avec 55 et 665 comme valeurs extrêmes et 23 sérums sur 29 dépassent 100. Le test de floculation est ici sans équivoque et en parfait accord avec la sérologie classique, ce qui nous a conduits à admettre, provisoirement et comparativement, qu'une  $\Delta$  D.O. de 50 pouvait constituer le seuil de positivité.

### 2. Animaux infectés à sérologie anormale (malades anciens, porteurs chroniques, animaux traités) :

a) dont les sérums sont absolument négatifs à tous les tests sérologiques classiques, mais contiennent de l'antigène circulant.

Sur les 53, 2 animaux seulement remplissent ces conditions; leurs sérums sont négatifs au test de floculation aussi ( $\Delta$  D.O. : 7 et 15);

b) dont les sérums sont très positifs en fixation du C', mais sont négatifs ou douteux aux tests d'agglutination.

15 sérums ont ces caractéristiques; 9 seulement entraînent une variation de D.O. supérieure à 50, que nous considérons comme le seuil de positivité. Pour les 6 autres, les résultats sont douteux : 46, 40, 38, 30, 29 et 24;

c) dont les sérums sont négatifs en fixation du C' et positifs aux tests d'agglutination.

Un seul sérum répond à ces critères et la  $\Delta$  D.O. observée est de 38, ce qui reste douteux.

d) dont les sérums sont positifs en fixation du C', mais dont les résultats aux tests d'agglutination sont dissociés :

$\alpha$ ) agglutination directe nettement positive, indirecte négative ou de très bas titre ( $< 1/40$ ).

4 sérums ont ces caractéristiques : on enregistre des valeurs  $\Delta$  D.O. presque nulles : 15, 8, 8 et 7.

Ce résultat est important à considérer, car sur les particules sensibilisées (hématies ou latex) ne sont fixées en principe que les molécules de galactane (ou leurs fragments).

$\beta$ ) agglutination directe négative, indirecte très positive.

2 sérums sont ainsi classés : les valeurs des  $\Delta$  D.O. sont élevées : 125 et 72.

Un tel résultat s'ajoutant au précédent laisse soupçonner l'importance des anticorps anti-galactane dans le phénomène de floculation.

## C. Rôle du galactane et des anticorps correspondants dans le test de floculation

L'importance de ce rôle se démontre en effectuant sur les mêmes sérums des tests comparatifs de floculation, utilisant d'une part l'antigène normal au 1/10 et d'autre part des solutions titrées de galactane purifié (à 25, 50, 100 et 250  $\mu$ g/ml). On s'aperçoit vite que les solutions à 100 et 250  $\mu$ g ont une activité de précipitogène pratiquement équivalente à celle de notre antigène total U.S.; cela n'est pour



surprendre, mais il importe de savoir si, à côté de ce système précipitant majeur, d'autres précipitines interviennent dans la floculation observée.

La preuve en est apportée par des tests effectués avec des sérums absorbés : 4 sérums de malades naturels, positifs au test de floculation, sont absorbés par du galactane purifié, à raison de 1,25 mgr de ce polyside par millilitre de

sérum. L'immun précipité est éliminé par une centrifugation à haute vitesse (35.000 g) et les sérums débarrassés de leurs anticorps anti-galactane sont soumis simultanément au test de floculation avec l'antigène U.S. dilué au 1/10 et au test d'hémagglutination passive (hématies de mouton sensibilisées par une solution de galactane à 100 µg/ml). Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau I :

**TABLEAU 1**  
**Tests de floculation sur sérums absorbés**

Numéros des sérums	<i>Hémagglutination passive</i>		<i>Variation de densité optique</i>	
	Titre		au bout d'une heure	
	avant l'absorption	après	avant l'absorption	après
1937	1/1280	0	95	65
1946	1/2560	0	185	35
1965	1/2560	0	290	95
1986	1/40	0	85	85

On y voit clairement que l'absorption a éliminé complètement les anticorps anti-galactane, car le titre d'hémagglutination passive est devenu nul. Par contre, le test de floculation est encore positif à des degrés divers, ce qui montre bien que des précipitogènes autres que le galactane sont en jeu.

Le cas du sérum n° 1986 est particulièrement intéressant : il est le seul des quatre à contenir de l'antigène circulant et il n'est donc pas étonnant que son titre d'hémagglutination soit bas (1/40). Le résultat du test de floculation n'est pas modifié par l'absorption et pour cause; les anticorps anti-galactane ne sont pas en jeu ici, certainement saturés par l'antigène circulant.

Cette observation n'est pas unique : sur 21 sérums contenant tous de l'antigène circulant et ayant des titres nuls ou très bas aux tests d'agglutination directe et indirecte, 15 sont trouvés positifs avec des  $\Delta$  D.O. supérieures à 50. Ce résultat est toutefois inférieur à celui de la fixation du complément qui en décèle 19.

## COMMENTAIRES

### A. Conditions techniques du test

1. L'emploi d'un spectrophotomètre pour l'exécution de ce test est à coup sûr une obligation technique coûteuse, mais la plupart des laboratoires de recherches microbiologiques possèdent aujourd'hui un tel instrument, indispensable pour de nombreuses mesures d'ordre chimique ou biologique.

Nous nous sommes servis d'un appareil de recherche de haute précision, mais il est certain, au vu des résultats, que les mesures n'ont pas besoin d'être effectuées au millième de D.O. près, c'est-à-dire que des spectrophotomètres plus simples et à performances moindres peuvent être employés.

Pour les mesures en série, il est commode d'utiliser une microcuve à écoulement.

En effet, au lieu de laisser la réaction de floculation se poursuivre dans la ou les cuves de l'appareil, on peut l'exécuter dans des tubes



séparés, tubes dans lesquels on prélève à des temps déterminés des volumes minimes qui servent aux mesures. Un opérateur entraîné peut alors effectuer des tests par dizaines dans un court délai (par sérum, il suffit de deux mesures durant une minute chacune, avec le rinçage de la cuve).

2. Pour l'antigène employé se pose un problème de normalisation : il est en effet nécessaire que les lots d'antigène soient, sinon identiques, du moins très comparables sur le plan de leur activité sérologique.

Le simple dosage des protéines totales par absorption à la longueur d'onde de 280 m $\mu$  permet de faire une première comparaison; un second test est effectué vis-à-vis d'un sérum précipitant conservé lyophilisé et qui sert d'étalon. Il se révèle que, si le protocole de préparation est soigneusement respecté, les antigènes obtenus ont une activité sérologique semblable. C'est ainsi que les trois lots utilisés au cours de ce travail contenaient respectivement 15 mg, 17,2 mg et 16 mg de protéines totales par ml; dilués au 1/10 et mis en présence du sérum étalon dilué aussi au 1/10, les  $\Delta$  D.O. enregistrées variaient de 110 à 115, ce qui représente une excellente concordance.

3. Les sérums à examiner doivent en principe être limpides. Aussi sont-ils en routine soigneusement centrifugés avant d'être éprouvés.

Le test de floculation permet cependant d'employer des sérums tout-venants, plus ou moins hémolysés; le degré d'hémolyse peut même être important, le phénomène de précipitation n'en est pas moins net si le sérum en cause est réellement positif. C'était le cas d'un bon tiers des sérums récoltés sur le terrain en Afrique et reçus à notre laboratoire après des délais divers (3 à 10 jours).

Par contre, les contaminations microbiennes et la répétition des cycles gel-dégel (lorsque les sérums conservés au congélateur en sortent fréquemment) sont absolument à proscrire, la destruction des anticorps ou de leur activité étant un phénomène indéniable; mais cela vaut pour tous les tests sérologiques.

4. Les phénomènes de floculation non spécifiques, redoutés au départ de ces essais, semblent, sinon inexistantes, du moins rares et de faible ampleur, sans commune mesure avec la floculation spécifique.

En fait, c'est le phénomène inverse qui est apparu quelquefois c'est-à-dire la diminution de la densité optique terminale par rapport à celle du départ, observée *exclusivement avec des sérums négatifs* : tout se passe comme si l'antigène devenait plus « soluble » et donc plus limpide après son mélange au sérum.

Il arrive aussi, mais *exclusivement avec les sérums très positifs*, que la  $\Delta$  D.O. atteigne son maximum en 30 minutes et soit fortement diminuée au bout d'une heure, l'immun-précipité sédimentant très vite au fond du tube ou même dans la cuve du photomètre; d'où l'obligation d'homogénéiser avec soin les mélanges soumis aux mesures.

## B. Intérêt du test

Ce test est pour l'instant d'ordre expérimental et son principal intérêt, à nos yeux, est d'ouvrir la voie aux méthodes de précipitation quantitative applicables désormais à l'immunologie de la péripneumonie.

Peut-on en faire un test de diagnostic sérologique ? Cela n'est pas exclu, encore que l'importance du rôle joué par le galactane dans cette réaction de floculation soit de nature à réduire la confiance qu'on est tenté de lui accorder; mais il est particulièrement intéressant de constater que ce galactane n'est pas le seul antigène en cause et que les autres précipitogènes concourent au phénomène global de floculation.

## CONCLUSIONS

Il est donc possible de mettre en œuvre un test quantitatif de floculation pour l'étude immunologique de la péripneumonie, en utilisant un antigène total de *M. mycoides* obtenu par traitement aux ultra-sons et un procédé néphélométrique pour évaluer l'importance de l'immunprécipité.

S'il est certain que le galactane joue son rôle important d'antigène majeur, il est non moins certain que les autres antigènes constituant du mycoplasme interviennent pour une part notable dans le phénomène.

Il est encore trop tôt pour dire que ce test peut être utilisé comme moyen de diagnostic sérologique; nous pensons plutôt qu'il est d'abord un test de recherche expérimentale et qu'il permettra d'appliquer à l'étude immunologique de cette mycoplasmosse la méthode de précipitation quantitative.

## SUMMARY

**Specific *M. mycoides* antibodies can be detected and measured in bovine sera by a flocculation test**

Antibody measurements are carried out by a nephelometric method, using a spectrophotometer, on serum-antigen mixtures; the antigen is extracted from a dense suspension of *M. mycoides* cells by ultrasonic disintegration.

This method, which is at first studied from a theoretic point of view, is applied to 144 cattle sera from non-infected, vaccinated and naturally infected animal. The results are compared with those of the usual serological tests.

It seems certain that all the antigenic components of *M. mycoides* play a role in this test, which increases its interest.

## RESUMEN

**Búsqueda de los anticuerpos anti-*Mycoplasma mycoides* mediante una prueba de floculación**

Se pueden descubrir y medir los anticuerpos específicos en el suero de bovinos mediante una prueba de floculación.

Se efectuaron medidas por nefelometría, mediante un espectrofotómetro, con las mezclas suero-antígeno; Se prepara este antígeno por tratamiento con ultrasones de una suspensión densa de micoplasmas.

Después de haber hecho un esquema teórico de dicha prueba, se la comprueba con 144 sueros de bovinos (indemnes, vacunados, enfermos naturales); Se hace una primera interpretación comparativa de los resultados obtenidos con los dados por las pruebas serológicas habituales.

Parece cierto que todos los antígenos constituyentes de *M. mycoides* intervienen en esta prueba de floculación cuyo interés así pues se aumenta.

## BIBLIOGRAPHIE

1. DANDLIKER (W. B.), DE SAUSSURE (V. A.), GROW (T. E.), « Turbidimetric method for the assay of antiviral antibodies », *J. Virology*, 1969, **3** (3): 283-289.
2. GOURLAY (R. N.), « Comparison between some diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia », *J. Com. Path.*, 1965, **75**: 97-109.
3. NAKAMURA (N.), FUTAMURA (H.), WATANUKI (T.), « On the practical value of several serological reactions for the diagnosis », *J. Jap. Soc. vet. Sci.*, 1926, **5**: 296-321.
4. PERREAU (P.) et BERGERON (D.), « Emploi de particules de latex dans la sérologie de la péripneumonie des bovidés (réaction d'agglutination indirecte) », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, **16** (3): 299-304.
5. PERREAU (P.), PROVOST (A.), REGNOULT (R.) et ORUE (J.), « Valeur de la réaction d'hémagglutination indirecte dans la péripneumonie bovine », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1964 **17** (1): 5-14.
6. PERREAU (P.), « Le test d'allergie et le diagnostic de la péripneumonie bovine. I. - Commentaires sur l'extraction de l'antigène protéique et étude expérimentale sur animaux de laboratoire », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** (4): 457-469.
7. PERREAU (P.) GAYT (P.) et MONNIER (J.), « La méthode d'immunofluorescence et l'identification des mycoplasmes. Application du diagnostic de la péripneumonie », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22** (4): 481-93.
8. PROVOST (A.) et QUEVAL (R.), « Recherches immunologiques sur la péripneumonie. X. Proposition d'une nouvelle technique sérologique pour le diagnostic expérimental de la maladie: le test des quatre tubes », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21** (3): 317-34.
9. SHIFRINE (M.), GOURLAY (R. N.), « Evaluation of diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia », *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1967, **15** (1): 7-10.
10. STONE (S. S.), BYGRAVE (A. C.), « Contagious bovine pleuropneumonia: comparison of serological tests and post-mortem observations in cattle with resolving lung lesions », *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1969, **17** (1): 11-19.